

Microsatellite DNA를 이용한 말 집단의 유전적 특성 및 유연 관계

조길재*

경북대학교 수의과대학

Received April 6, 2007 / Accepted May 7, 2007

Genetic Relationship and Characteristics Using Microsatellite DNA Loci in Horse Breeds. Gil Jae Cho*. *College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea* – The present study was conducted to investigate the genetic characteristic and to establish the parentage verification system of the Korean native horse (KNH). A total number of 192 horses from six horse breeds including the KNH were genotyped using 17 microsatellite loci. This method consisted of multiplexing PCR procedure. The number of alleles per locus varied from 5 to 10 with a mean value of 7.35 in KNH. The expected heterozygosity and observed heterozygosity were ranged from 0.387 to 0.841 (mean 0.702) and from 0.429 to 0.905 (mean 0.703), respectively. The total exclusion probability of 17 microsatellite loci was 0.9999. Of the 17 markers, AHT4, AHT5, CA425, HMS2, HMS3, HTG10, LEX3 and VHL20 marker have relatively high PIC value (>0.7). This study found that there were specific alleles, P allele at AHT5, Q allele and R allele at ASB23, H allele at CA425, S allele at HMS3, J allele at HTG10 and J allele at LEX3 marker in KNH when compared with other horse populations. Also, the results showed two distinct clusters: the Korean native horse cluster (Korean native horse, Mongolian horse), and the European cluster (Jeju racing horse, Thoroughbred horse). These results present basic information for detecting the genetic markers of the KNH, and has high potential for parentage verification and individual identification of the KNH.

Key words – Genetic characteristic, Korean native horse, microsatellite marker, specific allele

서론

말은 인간에게 고기와 가죽을 제공하는 수렵의 대상으로 인식되다가 인간의 필요에 따라 약 4,000년 전부터 가축화되기 시작하여 전차운반용, 쪼개고기를 제공하는 육용, 노역이나 운송의 수단 등으로 사용되었다. 그러나 현재는 삶의 질 향상과 레저문화의 발달에 힘입어 인간 노동력의 수단이 아닌 놀이수단이나 반려동물로 인식되면서 주로 경마나 승마 혹은 관상용으로 많이 이용되고 있으며 전 세계적으로 약 200여 품종의 말이 사육되고 있는 것으로 알려져 있다.

최근 들어 사람과 마찬가지로 대부분의 동물에 있어서도 개체식별이나 친자확인, 멸종위기에 처한 동물의 보존, 기원과 관련된 계통분류, 생산이력 추적 등에 microsatellite DNA 분석기법을 많이 이용하고 있다[6,22,25]. 말에서는 주로 혈통등록이나 번식등록 시에 개체식별 및 친자확인을 목적으로 microsatellite DNA 분석기법을 응용하고 있다[3,8]. Microsatellite는 크기가 100-400 bp 정도로서 심한 손상을 입은 시료나 적은 양의 DNA로도 증폭이 가능하다. Variable Number of Tandem Repeat(VNTR)의 경우는 대립유전자의 수가 많아서 정확한 유전자의 크기를 측정하기가 어렵지만 microsatellite는 VNTR보다 대립유전자의 수가 적어 정확하

게 확인이 가능하고 검출이 간편한 것으로 알려져 있어 사람을 포함한 산업동물이나 반려동물, 해양동물, 야생동물 등의 다양한 동물에서 개체식별이나 친자확인에 microsatellite marker를 많이 이용하고 있는 실정이다[19,21,25].

현재까지 microsatellite의 기능에 관해서 정확하게 알려진 바는 없지만 모든 척추동물의 유전자 내에 공통적으로 나타나는 부위로 반복횟수에 따른 염기서열의 길이가 다양하며, 각 marker마다 많은 대립유전자가 존재하는 것으로 보고되어 있다. 이러한 길이 다형성은 멘델의 유전법칙에 따라 부모로부터 자손에게 유전되어 염색체 상에 대립유전자의 형태로 존재하여 각 개체마다 유전적인 다형성을 나타내고 있다.

친자감정에 있어서 microsatellite와 minisatellite를 동시에 사용할 수 있으나 국제적인 유전자지도 작성 시 표준적으로 이용되고 있는 microsatellite를 이용하면 손쉽게 증폭 primer를 확보할 수 있을 뿐 아니라, 다양한 유전자형을 관찰할 수 있고 개체의 독특한 유전적 특성을 파악할 수 있으므로 개체식별 및 친자감정을 통한 혈통등록을 위한 표지인자로 유용하게 사용하고 있다.

말의 혈통보존 및 개량증식을 목적으로 등록을 하기 위해서는 축산법 및 말(더러브렛 포함) 등록규정에 근거하여 모색유전의 법칙과 혈액형 혹은 유전자 감정에 의해서 개체식별 및 친자관계가 확인되어야 한다[8]. 현재 더러브렛 말의 경우는 국제혈통서위원회(ISBC)와 국제동물유전학회(ISAG)

*Corresponding author

Tel : +82-53-950-5978, Fax : +82-53-950-5955

E-mail : chogj@knu.ac.kr

말 분과위원회에서 권장하고 있는 국제최소검사항목 9개 marker를 포함하여 15개 내외의 microsatellite marker를 각국의 상황에 따라 이용하고 있는 실정이다. 그러나 각국에서 사육하고 있는 재래종 말은 특별히 공통적인 국제기준이 없어 각국의 여건에 따라 다양하게 검사하고 있으나 대개는 더러브렛 말의 감정 기준에 준해서 실시하고 있다.

우리나라 고유의 재래마인 제주마는 현재 제주도에서 microsatellite DNA분석기법과 모색유전인자에 대한 검사 등에 기초하여 개체식별이나 친자판정을 실시하고 있으나, 감정 결과에 대한 이해 당사자간의 신뢰성에 문제가 끊임없이 제기되고 있는 실정이다. 이러한 문제점을 극복하기 위해서는 지금까지 여러 연구자들[6,10,13,23]에 의해 보고된 바 있는 microsatellite DNA marker중에서 제주마 집단의 특성을 가장 잘 나타내면서 국제기준에 부합되는 microsatellite DNA marker를 선택하여 제주마의 혈통등록을 위한 유전자 감정에 이용할 필요가 있다. 따라서 본 연구에서는 국내에서 사육중인 제주마의 유전적 특성 및 계통학적 연구를 위한 기초 자료를 확립하고자 제주마를 포함한 외래 품종을 대상으로 microsatellite DNA marker를 이용하여 제주마의 특이 대립유전자 분포 등 말의 유전적 다양성과 타 집단과의 유전적 관련성을 분석하였다.

재료 및 방법

공시재료

국내에서 사육중인 말 192두[제주마(Korean native horse) 84두, 제주경주마(Jeju racing horse) 37두, 몽고마(Mongolian horse) 25두, 더러브렛 말(Thoroughbred horse) 26두, 워브리드 말(Warmblood horse) 11두, 미니쉼어 말(Miniature horse) 9두]을 대상으로 하였다. 재료는 말의 경정맥으로부터 Heparin tube (Becton Dickson, USA)로 채혈한 혈액에서 Tozaki 등[23]의 방법에 의해 추출한 genomic DNA를 사용하였다.

Microsatellite DNA marker 선정 및 중합효소연쇄반응(PCR)

Microsatellite DNA형 분석을 위한 marker는 국제 panel 중에서 17개를 선정(Table 1)하여 Bozzini 등[4]과 Dimsoski [10]의 방법에 준하여 DNA를 GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, 미국)으로 증폭하였다. 사용된 primer는 multiplex-PCR을 수행하였으며 PCR 과정은 다음과 같다. 먼저 95°C에서 10분간 가열하여 변성을 유도하고, 95°C에서 30초간 denaturation, 60°C에서 1분간 annealing 그리고 72°C에서 1분간 extension의 3단계를 총 30회 반복하였으며 마지막으로 72°C에서 60분간 final extension 과정을 거쳤다. 증폭된 DNA는 2.5% agarose gel로 전기영동하여 증폭산물을 확인한 후 microsatellite DNA다형 분석에 이용하였다.

Microsatellite DNA다형 및 통계 분석

Microsatellite DNA형 분석은 PCR 산물 1 µl, GeneScan® 500 RIZ size standard (Applied Biosystems, 미국) 0.4 µl, deionized Hi-Di formamide (Applied Biosystems, 미국) 12 µl을 혼합하여 95°C에서 3분간 denaturation 시킨 후 ice 위에서 3분간 침지한 다음, 유전자형 자동분석기(ABI Prism 3100 analyzer, 미국)에 loading하여 POP4 (Applied Biosystems, 미국)상에서 15 kV로 전기영동하였다. 그 후 Data는 GeneScan Software Ver.3.7과 Genotyper Software Ver.3.7 (Applied Biosystems, 미국)을 이용하여 각 marker별 대립유전자의 크기(base pair)를 결정하였고, 대립유전자의 명명은 국제기준에 준하였다. 또한 microsatellite DNA다형 좌위의 대립유전자 출현빈도를 추정하고 이를 토대로 이형접합성(Het), 다형정보량(PIC), 부권부정율(PE), 그리고 집단간의 유연관계는 Cervus Ver.2.0 program[18]과 Saitou와 Nei[20]의 방법에 따라 분석하였다.

결 과

Microsatellite DNA다형 분석

말 6개 품종 192두를 대상으로 17개의 microsatellite DNA marker를 분석한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 말 6개 품종의 유전자(DNA)형을 분석하여 비교한 결과 각 품종별로 특이한 대립유전자가 관찰되었다. 제주마의 경우 AHT5 marker에서 대립유전자 P, ASB23 marker에서 대립유전자 Q와 R, CA425 marker에서 대립유전자 H, HMS3 marker에서 대립유전자 S, HTG10 marker에서 대립유전자 J, LEX3 marker에서 대립유전자 J 등 모두 6개 marker에서 7개의 특이 대립유전자가 관찰되었다. 몽고마에서만 관찰된 대립유전자는 ASB2 marker에서 대립유전자 P, HMS2 marker에서 대립유전자 R, HMS3 marker에서 대립유전자 K, HMS6 marker에서 대립유전자 Q, HMS7 marker에서 대립유전자 K, HTG6 marker에서 대립유전자 M 등 6개 marker에서 6개의 대립유전자가 관찰되었고, 더러브렛종 말은 ASB2 marker에서 대립유전자 B, HMS2 marker에서 대립유전자 N, HMS6 marker에서 대립유전자 I, HTG6 marker에서 대립유전자 N, LEX3 marker에서 대립유전자 Q 등 4개 marker에서 5개의 대립유전자가 관찰되었다. 워브리드 말에서는 HMS7 marker에서 대립유전자 P와 HTG6 marker에서 대립유전자 L 등 2개 marker에서 2개의 대립유전자가 관찰되었으나, 제주경주마와 미니쉼어 말에서는 타 품종과 구별되는 특이적인 대립유전자가 관찰되지 않았다.

제주마의 이형접합성(Het), 다형정보량(PIC), 부권부정율(PE) 분석

제주마의 microsatellite DNA형의 유전자 빈도에 기초하여 이형접합성(Het), 다형정보량(PIC), 부권부정율(PE)을 분

Table 1. Characteristics of 17 microsatellite loci used in this study

Locus	Primer sequence(5'→3')	Allele size(bp)	References
AHT4	(FAM)- AACCGCCTGAGCAAGGAAGT GCTCCCAGAGAGTTTACCCT	138-170	[2]
AHT5	(VIC)- ACGGACACATCCCTGCCTGC GCAGGCTAAGGGGGCTCAGC	128-152	[2]
ASB2	(VIC)- CCACTAAGTGTCGTTTCAGAAGG CACAACCTGAGTTCTCTGATAGG	222-266	[5]
ASB17	(PET)- GAGGGCGGTACCTTTGTACC ACCAGTCAGGATCTCCACCG	89-131	[5]
ASB23	(VIC)- GCAAGGATGAAGAGGGCAGC CTGGTGGGTTAGATGAGAAGTC	176-212	[15]
CA425	(PET)- AGCTGCCTCGTTAATTCA CTCATGTCCGCTTGTCTC	230-250	[11]
HMS1	(PET)- CATCACTCTTCATGTCTGCTTGG TTGACATAAATGCTTATCCTATGGC	166-178	[14]
HMS2	(NED)- CTTGCAGTCGAATGTGATTTAAAT ACGGTGGCAACTGCCAAGGAAG	218-238	[14]
HMS3	(NED)- CCAACTCTTTGTCACATAACAAGA CCATCCTCACTTTTTCACITTTGTT	150-174	[14]
HMS6	(VIC)- GAAGCTGCCAGTATTCAACCATTG CTCCATCTTGTGAAGTGTAECTCA	153-171	[14]
HMS7	(FAM)- CAGGAAACTCATGTTGATACCATC TGTTGTTGAAACATACCTTGACTGT	167-189	[14]
HTG4	(FAM)- CTATCTCAGTCTTGATTGCAGGAC CTCCCTCCCTCCCTCTGTCTC	127-141	[12]
HTG6	(VIC)- GAAGCTGCCAGTATTCAACCATTG CTCCATCTTGTGAAGTGTAECTCA	153-171	[14]
HTG7	(NED)- CCTGAAGCAGAACATCCCTCCTTG ATAAAGTGTCTGGGCAGAGCTGCT	118-130	[17]
HTG10	(NED)- CAATTCGCGCCCAACCCCGGCA TTTTTATTCGTGATCTGTACATTT	89-171	[17]
LEX3	(PET)- ACACTCTAACCCAGTGTGAGACT GAAGGAAAAAAGGAGGAAGAC	137-160	[9]
VHL20	(FAM)- CAAGTCCTTACTTGAAGACTAG AACTCAGGGAGAATCTTCTGAG	89-107	[24]

석한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다. 제주마에서 관찰된 대립유전자의 수는 총 125개로 나타났고, 각 marker별로 관찰된 대립유전자의 수는 HTG4와 HTG7 marker의 5개부터 ASB17, HTG10, LEX3 marker의 10개까지 분포하였으며 marker당 평균 대립유전자의 수는 7.35개로서 몽고마에서 관찰된 대립유전자의 전체 130개(평균 7.65개)보다는 낮은 수치였다. 관찰된 이형접합성(observed heterozygosity)과 기대된 이형접합성(expected heterozygosity)은 각각 0.429-0.905(평균 0.703)와 0.387-0.841(평균 0.702)로 나타났다. 다형정보량(PIC)은 0.354(HTG6)-0.816(LEX3)로서 평균 0.659로 나타났으며 17개 marker중 AHT4, AHT5, CA425, HMS2, HMS3,

HTG10, LEX3, VHL20 marker 등이 다형정보량(PIC) 0.7 이상을 나타내었다. 17개 marker에 대한 전체 부권부정율(친부마 혹은 친모마 하나의 DNA형을 알고 있을 경우)을 제주마에 적용 시 99.99%로 나타났다.

말 6개 품종의 이형접합성(Het), 다형정보량(PIC), 부권부정율(PE) 분석

말 6개 품종 192두를 대상으로 유전자(DNA)형을 분석한 결과는 Table 4와 5에서 보는 바와 같이 대립유전자의 수는 5(HTG7)-15(ASB17)개로 평균 9개로서 품종별로 분석하였을 때 평균 대립유전자의 수는 7.64개(몽고마)-4.23개(미니쥬어

Table 2. Allele distribution of 17 microsatellite DNA markers in 6 horse breeds

Loci	KNH	JRH	MH	TH	WBH	MTH*
AHT4	H,I,J,K,L,M,N,O,P	H,I,J,K,L,O,P	H,I,J,K,L,M,N,O,P	H,J,K,O	H,J,K,O	I,J,K,N,O
AHT5	J,K,L,M,N,O,P	J,K,L,M,N,O	J,K,L,M,N,O	J,K,M,N,O	J,K,M,N	J,N,O
ASB2	I,K,L,M,N,O,Q	K,M,N,O,Q,R	K,L,M,N,O,P,Q	B,K,M,N,O,Q,R	I,K,M,N	M,N,Q
ASB17	F,H,I,J,K,N,O,P,Q,R	G,H,J,K,M,N,O,P,Q,R	H,I,J,K,M,N,O,P,Q,R,S,T	G,M,N,O,R	F,G,M,N,O,P,R	F,K,N,Q,S,T
ASB23	I,J,K,L,Q,R,T,U	I,J,K,L,T,U	I,J,K,L,S,T,U	I,J,K,L,S	I,J,K,L,T	I,J,K,T
CA425	F,H,I,J,L,M,N,O	G,I,J,L,M,N,O	F,G,I,J,K,L,M,N,O	I,J,L,M,N,O	G,I,N	F,G,K,M,N,O
HMS1	I,J,K,L,M,O	I,J,L,M	I,J,K,L,M,N,O	I,J,M,N	I,J,M	J,M
HMS2	H,I,J,K,L	H,I,J,K,L,M	H,I,J,K,L,M,R	I,J,M,N	I,J,M	H,I,K,L,M
HMS3	I,M,O,P,Q,R,S	I,M,N,O,P,R	I,K,M,N,O,P,Q,R	I,M,N,O,P	I,M,N,O,P	I,M,O,P,R
HMS6	K,L,M,N,O,P	K,L,M,N,O,P	K,L,M,N,O,P,Q	I,K,L,M,P	K,L,M,O,P	K,O,P
HMS7	J,L,M,N,O,Q	J,L,M,N,O	J,K,L,M,N,O,Q	J,L,M,N,O	J,L,M,N,O,P	L,M,N,O
HTG4	K,L,M,O,P	K,L,M,N,O,P	K,L,M,O,P	K,M,N,P	K,L,M,N,P	L,M,P
HTG6	G,I,J,O,P,R	G,I,J,O	G,I,J,M,O	G,J,N,O,R	G,I,J,L,O,P,R	G,J,O
HTG7	K,M,N,O,P	K,M,N,O,P	K,M,N,O	K,N,O	K,M,N,O	K,N,O
HTG10	I,J,K,L,M,N,O,P,Q,R	I,K,L,M,N,O,P,Q,R,S	I,K,L,M,N,O,P,Q,R	I,K,L,M,O,R	I,K,L,O,S	I,K,M,N,O,Q,R
LEX3	F,H,I,J,K,L,M,N,O,P	F,H,I,L,M,N,O,P	F,G,H,I,K,L,M,N,O,P	H,M,N,O,P,Q	G,H,L,M,N,O,P	G,I,K,M,N
VHL20	I,J,L,M,N,O,P,Q,R	I,L,M,N,P,Q	I,J,L,M,N,O,P,Q,R	I,L,M,N	I,L,M,N,P,Q	I,J,M,N,P

*KNH : Korean native horse, JRH : Jeju racing horse, MH : Mongolian horse, TH : Thoroughbred horse, WBH : Warmblood horse, MTH : Miniature horse.

말)로 분포하였고 17개 marker 전체에서는 153개의 대립유전자가 검출되었다. 관찰된 이형접합성(observed heterozygosity)과 기대된 이형접합성(expected heterozygosity)은 각각 0.443-0.854(평균 0.696)와 0.647-0.867(평균 0.773)로 나타났다. 다형정보량(PIC)은 0.604(HTG4)-0.850(LEX3)으로 평균 0.742로 나타났다. 또한 품종별로 분석한 결과 기대된 이형접합성(expected heterozygosity)과 관찰된 이형접합성(observed heterozygosity)은 각각 0.7950±0.0141(몽고마)-0.6751±0.0378(미니슈어 말), 0.7135±0.0180(제주경주마)-0.5621±0.0401(미니슈어 말)로 나타났다. 말 6개 품종을 17개 microsatellite marker로 분석한 결과 몽고마, 제주마, 제주경주마 등의 순으로 높은 유전적 다양성을 보였다.

말 집단의 유전적 거리와 유연 관계

말 6개 품종에 대한 유전적 유연 관계를 분석한 결과는 Table 6과 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 제주마와 가장 가까운 유전적 유연 관계를 나타낸 집단은 몽고마로서 Da genetic distance에서 0.1517로 나타났고, 제주경주마와는 0.2628의 유전적 거리를 보였다. Da genetic distance의 matrix를 이용하여 Neighbor Joining tree를 작성한 결과 두 개의 주요한 군집들로 구분됨을 확인할 수 있었다. 군집들 중 하나는 제주마와 몽고마로서 재래종 말 이었으며, 다른 하나의 군집에는 개량종인 더러브렛 말과 잡종마인 제주경주마로 구분되었다.

고 찰

제주마의 유전적 다양성이나 유입경로 추적 등과 관련된

Table 3. Number of allele, heterozygosity, PIC value and PE of microsatellite markers in the 84 Korean native horses

Loci	No. of allele	OHet	EHet	PIC	PE*
AHT4	9	0.798	0.803	0.770	0.607
AHT5	7	0.821	0.742	0.703	0.524
ASB2	7	0.560	0.629	0.571	0.380
ASB17	10	0.762	0.739	0.693	0.506
ASB23	8	0.512	0.713	0.664	0.478
CA425	8	0.774	0.753	0.711	0.530
HMS1	6	0.607	0.646	0.577	0.378
HMS2	6	0.869	0.774	0.734	0.554
HMS3	7	0.821	0.795	0.763	0.600
HMS6	6	0.810	0.704	0.655	0.464
HMS7	6	0.571	0.517	0.490	0.322
HTG4	5	0.643	0.596	0.526	0.331
HTG6	6	0.429	0.387	0.354	0.205
HTG7	5	0.726	0.707	0.665	0.479
HTG10	10	0.905	0.825	0.797	0.649
LEX3	10	0.464	0.841	0.816	0.676
VHL20	9	0.881	0.754	0.720	0.548
Mean	7.35	0.703	0.702	0.659	0.9999**

*OHet : Observed heterozygosity, EHet : Expected heterozygosity, PIC : Polymorphic information contents, PE : exclusion probability

**Total exclusion probability.

연구에서 Tozaki 등[22]은 TKY2의 19개 microsatellite marker로 분석한 결과 제주마의 대립유전자 수는 3-10개(평균 5.9

Table 4. Number of allele, heterozygosity, PIC value and PE of microsatellite markers in 6 horse breeds

Loci	No. of allele	OHet	EHet	PIC	PE*
AHT4	9	0.786	0.852	0.832	0.697
AHT5	7	0.792	0.819	0.791	0.634
ASB2	10	0.641	0.790	0.760	0.597
ASB17	15	0.734	0.823	0.801	0.660
ASB23	9	0.604	0.752	0.717	0.545
CA425	10	0.641	0.736	0.710	0.545
HMS1	7	0.589	0.668	0.607	0.412
HMS2	9	0.703	0.808	0.778	0.617
HMS3	9	0.703	0.817	0.790	0.635
HMS6	8	0.750	0.761	0.719	0.534
HMS7	8	0.656	0.725	0.691	0.515
HTG4	6	0.625	0.647	0.604	0.415
HTG6	9	0.568	0.691	0.655	0.476
HTG7	5	0.729	0.739	0.694	0.503
HTG10	11	0.854	0.849	0.828	0.692
LEX3	12	0.443	0.867	0.850	0.730
VHL20	9	0.812	0.806	0.782	0.632
Mean	9.00	0.696	0.773	0.742	1.0000**

*OHet : Observed heterozygosity, EHet : Expected heterozygosity, PIC : Polymorphic information contents, PE : exclusion probability
 **Total exclusion probability.

개)로서 일본 재래마(평균 2.1-5.1개), 앵글로 아랍(평균 4.5개)이나 더러브렛 말(평균 4.2개) 등 유럽종보다는 많으나 몽고마(평균 6.0-6.3개)보다는 적은 것으로 보고하였고, Cho[6]는 11개의 microsatellite marker를 이용하여 분석한 결과 제주마의 대립유전자 수는 5-13개(평균 8.27개)를 보고한 바 있다. 이들 결과와 본 연구에서 관찰된 제주마의 대립유전자 수(5-10개, 평균 7.35개)는 Tozaki 등[22]이 몽고마(평균 6.0-6.3개)보다 적은 것으로 보고한 결과와는 유사하지만, Cho[6]가 보고한 결과와는 약간의 차이가 인정되었다. 이는 공시한 시료가 다르고 선택한 marker가 상이한 것과 관련이 있는 것으로 사료된다.

지금까지 제주마와 다른 나라의 재래마 혹은 타 품종간의 유전적 다양성이나 기원 등에 관한 연구[6,22]는 많이 보고되었으나, 제주마와 타 품종간의 특이 대립유전자의 분포를 연구 보고한 경우는 거의 없는 실정이다. Kim 등[16]은 제주마와 더러브렛 말을 대상으로 Transferrin gene exon 13, 15, 16의 다형현상을 SSCP 방법으로 분석한 결과, 제주마 집단이 더러브렛 말 집단보다 높은 다형성과 제주마 집단간에 유전자형 빈도차를 확인할 수 있었다고 보고하였다. Cho[7]는 제주마 158두를 대상으로 적혈구항원형을 분석한 결과 3두에서 De 혹은 Dk(Dacdfgm, Dacdfgmn)와 Dc(Ddegmn) 대립유전자가 나타나지 않는 숨은 대립유전자를 보고한 바 있다.

Microsatellite marker를 이용한 제주마의 특이 대립유전자 분포 등 말의 유전적 다양성과 타 집단과의 유전적 관련성을 분석한 본 연구에서 제주마의 각 marker별 대립유전자의 수는 5-10개(평균 7.35개)로 분포하였고 제주마에서 관찰된 대립유전자의 총수는 125개가 관찰되어 평균 좌위 당 7.35개로서 몽고마의 130개(평균 7.65개)보다는 적었다. 또한 6개 품종의 말 유전자(DNA)형을 분석하여 비교한 결과 제주마에서 AHT5 marker는 대립유전자 P, ASB23 marker는 대립유전자 Q와 R, CA425 marker는 대립유전자 H, HMS3 marker는 대립유전자 S, HTG10 marker는 대립유전자 J, 그리고 LEX3 marker는 대립유전자 J 등 6개 marker에서 7개의 특이 대립유전자가 관찰되어 타 품종에 비해 제주마에서 marker별로 특이 유전자가 많이 나타났다. 그러나 집단간 유전자 분화정도를 나타내는 Gst값과 각 marker별 대립유전자의 수와의 상관관계는 알 수 없었다. 그리고 AHT4의 7개 marker에서 다량정보량(PIC)이 0.7 이상으로 나타났고, 17개 marker에 대한 전체 부권부정율이 99.99%로 나타난 결과로 미루어 이들 marker를 제주마의 친자판정에 활용하면 더 좋은 감정 효율을 얻을 수 있을 것으로 기대된다. 또한 품종의 보존을 위한 방향설정 시 유용하게 활용됨[1,13]은 물론 제주마와 타 품종을 구별할 수 있는 하나의 수단으로 이용할 수 있을 것으로 사료된다. 향후 한반도 주변 국가에서 사육하고 있는 재래마를 대상으로 더 많은 품종의 시료와 marker 및 다양한 분석기법을 이용하여 연구하면 제주마의 품종 특이

Table 5. Sample size, mean number of allele, expected heterozygosity(EHet), observed heterozygosity(OHet), polymorphic information content (PIC) of microsatellite loci for each breed

Population	Sample size	Mean no. of allele	EHet±SD	OHet±SD	PIC
KNH*	84	7.35	0.7015±0.0284	0.7031±0.0121	7.35±1.73
JRH	37	6.41	0.7397±0.0214	0.7135±0.0180	6.41±1.84
MH	25	7.64	0.7950±0.0141	0.7106±0.0220	7.65±2.15
TH	26	5.00	0.6916±0.0245	0.6176±0.0231	5.00±1.00
WBH	11	4.94	0.6990±0.0317	0.6363±0.0352	4.94±1.39
MTH	9	4.23	0.6751±0.0378	0.5621±0.0401	4.24±1.39

*KNH : Korean native horse, JRH : Jeju racing horse, MH : Mongolian horse, TH : Thoroughbred horse, WBH : Warmblood horse, MTH : Miniature horse.

Table 6. Matrix of Da genetic distances observed among the horse breeds

	KNH(JNH)	JRH	MH	TH	WBH*
JRH	0.2628				
MH	0.1517	0.1527			
TH	0.5419	0.1914	0.3682		
WBH	0.4519	0.1393	0.2649	0.2863	
MTH	0.3845	0.3395	0.2579	0.6344	0.3718

*KNH : Korean native horse, JRH : Jeju racing horse, MH : Mongolian horse, TH : Thoroughbred horse, WBH : Warmblood horse, MTH : Miniature horse.



Fig. 1. Dendrogram of 6 horse populations draw with Nei's Da distance. * JNH : Korean native horse, JHR : Jeju racing horse, MNH : Mongolian horse, TH : Thoroughbred horse, WBH : Warmblood horse, MTH : Miniature horse.

유전인자를 찾을 수 있을 것으로 사료된다.

말 6개 품종을 17개 microsatellite marker로 분석한 결과 몽고마, 제주마, 제주경주마 등의 순으로 높은 유전적 다양성을 나타냈으며 제주마와 가장 가까운 유전적 유연 관계를 나타낸 집단은 몽고마로서 Da genetic distance에서 0.1517로 나타났고, 제주경주마와는 0.2628의 유전적 거리를 보였다. 이를 토대로 Neighbor Joining tree를 작성한 결과, 제주마와 몽고마인 재래종 말 집단과 개량종인 더러브렛 말과 잡종마인 제주경주마 집단으로 구분됨을 확인할 수 있었다. 이는 Cho[6]가 제주마는 몽고마와 유전적으로 가까운 거리에 있는 것으로 보고한 것과 Tozaki 등[22]이 일본 재래마는 몽고마에서 제주도를 거쳐 일본으로 유입되었을 것으로 보고한 결과와 아주 밀접한 관계가 있음을 알 수 있다.

요 약

말 6개 품종 192두를 대상으로 17개의 microsatellite DNA marker를 이용하여 유전자(DNA)형을 분석하여 비교한 결과 제주마에서 각 marker별로 대립유전자의 수는 5-10개(평균 7.35개)로 분포하였고 제주마에서 관찰된 대립유전자는 총 125개가 관찰되어 평균 좌위 당 7.35개로서 몽고마의 130

개(평균 7.65개)보다는 낮은 수치였다. 또한 AHT5 marker에서 대립유전자 P, ASB23 marker에서 대립유전자 Q와 R, CA425 marker에서 대립유전자 H, HMS3 marker에서 대립유전자 S, HTG10 marker에서 대립유전자 J, LEX3 marker에서 대립유전자 J 등 6개 marker에서 7개의 특이 대립유전자가 관찰되었다. 관찰된 이형접합성(observed heterozygosity)과 기대된 이형접합성(expected heterozygosity)은 각각 0.429-0.905 (평균 0.703)와 0.387-0.841(평균 0.702)로 관찰되었고 다량정보량(PIC)은 0.354(HTG6)-0.816(LEX3)로서 평균 0.659로 나타났으며 17개 marker중 AHT4, AHT5, CA425, HMS2, HMS3, HTG10, LEX3, VHL20 marker 등이 다량정보량(PIC) 0.7 이상을 나타내었다. 17개 marker에 대한 전체 부권부정율(친부마 혹은 친모마 하나의 유전자형을 알고 있을 경우)을 제주마에 적용 시 99.99%로 나타났다.

말 6개 품종별로 분석하였을 때 평균 대립유전자의 수는 7.64개(몽고마)-4.23개(미니츄어 말)로 분포하였고 17개 marker 전체에서는 153개의 대립유전자가 검출되었다. 품종별로 분석한 결과 기대된 이형접합성(expected heterozygosity)과 관찰된 이형접합성(observed heterozygosity)은 각각 0.7950±0.0141(몽고마)-0.6751±0.0378(미니츄어 말), 0.7135 ±0.0180(제주경주마)-0.5621±0.0401(미니츄어 말)로 나타났다. 말 6개 품종을 17개 microsatellite marker로 분석한 결과 몽고마, 제주마, 제주경주마 등의 순으로 높은 유전적 다양성을 보였다. 제주마와 가장 가까운 유전적 유연 관계를 나타낸 집단은 몽고마로서 Da genetic distance에서 0.1517로 나타났고, 제주경주마와는 0.2628의 유전적 거리를 보였다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: 2005 0401034715)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. Aranguren-Mendez, J., J. Jordana and M. Gomez. 2001. Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers. *Genet. Sel. Evol.* 33, 433-442.
2. Binns, M. M., N. G. Uolmes and A. M. Holliman. 1995. The identification of polymorphic microsatellite loci in the horse and their use in thoroughbred parentage testing. *Brit. Vet. J.* 151, 9-15.
3. Bowling, A. T., M. L. Eggleston-Scott, G. Byrns, R. S. Clark, S. Dileanis and E. Wictum. 1997. Validation of microsatellite markers for routine horse parentage testing. *Anim. Genet.* 28, 247-252.
4. Bozzini, M., D. Fantin, J. S. Ziegler, H. van Haeringen, W. Jacobs, M. Ketcham, M. Spencer and S. Bates. 1996. Automated equine paternity testing. *Anim. Genet.* 27, 32.

5. Breen, M., G. Lindgren, M. M. Binns, J. Norman, Z. Irvin, K. Bell, K. Sandberg and H. Ellegren. 1997. Genetical and physical assignments of equine microsatellites—first integration of anchored markers in horse genome mapping. *Mamm. Genome* **8**, 267-273.
6. Cho, G. J. 2006. Genetic relationship among the Korean native and alien horses estimated by microsatellite polymorphism. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **19**, 784-788.
7. Cho, G. J. 2006. Detection of unusual allele in D system of red cell alloantigens found in the Korean native horse. *J. Life Sci.* **16**, 1109-1111.
8. Cho, G. J. and B. H. Kim. 2000. Studies on blood types in Thoroughbred horses. *Kor. J. Vet. Res.* **40**, 683-689.
9. Coogle, L., E. Bailey, R. Reid and M. Russ. 1996. Equine dinucleotide repeat polymorphisms at loci LEX002, -003, -004, -005, -007, -008, -009, -010, -011, -013 and -014. *Anim. Genet.* **27**, 126-127.
10. Dimsoski, P. 2003. Development of a 17-plex microsatellite polymerase chain reaction kit for genotyping horses. *Croat. Med. J.* **44**, 332-335.
11. Eggleston-Stott, M., A. L. DelValle, M. Bautista, D. Dileanis, E. Wictum and A. T. Bowling. 1997. Nine equine dinucleotide repeats at microsatellite loci UCDEQ136, UCDEQ405, UCDEQ412, UCDEQ425, UCDEQ437, UCDEQ467, UCDEQ487, UCDEQ502 and UCDEQ505. *Anim. Genet.* **28**, 370-371.
12. Ellegren, H., M. Johansson, K. Sandberg and L. Andersson. 1992. Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse. *Anim. Genet.* **23**, 133-142.
13. Glowatzki-Mullis, M. L., J. Muntwyler, W. Pfister, E. Marti, S. Rieder, P. A. Poncet and C. Gaillard. 2005. Genetic diversity among horse populations with a special focus on the Franches-Montagnes breed. *Anim. Genet.* **37**, 33-39.
14. Guerin, G., M. Bertaud and Y. Amigues. 1994. Characterization of seven new horse microsatellite: HMS1, HMS2, HMS3, HMS5, HMS6, HMS7 and HMS8. *Anim. Genet.* **25**, 62.
15. Irvin, Z., J. Giffard, R. Brandon, M. Breen and K. Bell. 1998. Equine dinucleotide repeat polymorphisms at loci ASB21, 23, 25 and 37-43. *Anim. Genet.* **29**, 67.
16. Kim, N. Y., S. S. Lee and Y. H. Yang. 2002. Polymorphisms of the exons 13, 15 and 16 of transferring gene in Cheju horses. *J. Anim. Sci. & Technol. (Kor.)* **44**, 391-398.
17. Marklund, S., H. Ellegren, S. Eriksson, K. Sandberg and L. Andersson, 1994. Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Anim. Genet.* **25**, 19-23.
18. Marshall, T. C., J. Slate, L. Kruuk and J. M. Pemberton. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* **7**, 639-655.
19. Menitti-Raymond, M. A., V. A. David, L. L. Wachter, J. M. Butler and S. J. O'Brien. 2005. An STR forensic typing system for genetic individualization of domestic cat (*Felis catus*) samples. *J. Forensic Sci.* **50**, 1061-1070.
20. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
21. Singh, A., A. Gaur, K. Shailaja, B. S. Bala and L. Singh. 2004. A novel microsatellite (STR) marker for forensic identification of big cats in India. *Forensic Sci. Int'l.* **141**, 143-147.
22. Tozaki, T., N. Takezaki, T. Hasegawa, N. Ishida, M. Kurosawa, M. Tomita, N. Saitou and H. Mukoyama. 2003. Microsatellite variation in Japanese and Asian horses and their phylogenetic relationship using a European horse outgroup. *J. Heredity* **94**, 374-380.
23. Tozaki, T., H. Kakoi, S. Mashima, K. I. Hirota, T. Hasegawa, N. Ishida, N. Miura, N. H. Choi-Miura and M. Tomita. 2001. Population study and validation of paternity testing for Thoroughbred horses by 15 microsatellite loci. *J. Vet. Med. Sci.* **63**, 1191-1197.
24. van Haeringen, H., A. T. Bowling, M. L. Stott, J. A. Lenstra and K. A. Zwaagstra. 1994. A highly polymorphic horse microsatellite locus: VHL20. *Anim. Genet.* **25**, 207.
25. Yoon, D. H., H. S. Kong, J. D. Oh, J. H. Lee, B. W. Cho, J. D. Kim, K. J. Jeon, C. Y. Jo, G. J. Jeon and H. K. Lee. 2005. Establishment of an individual identification system based on microsatellite polymorphisms in Korean cattle (Hanwoo). *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **18**, 762-766.